



## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr Moniki Oleksy-Wawrzyniak pt. „Ocena zdolności klinicznych szczepów bakteryjnych do tworzenia biofilmu oraz możliwości jego eradykacji z cewników moczowych za pomocą metod fizycznych i chemicznych” przygotowanej pod opieką naukową promotora dr hab. n. med. Marzenny Bartoszewicz, prof. nadzw. oraz promotora pomocniczego dr hab. n. med. Adama Junki w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.**

Zakażenia związane z tworzeniem przez drobnoustroje biofilmu są bardzo aktualnym problemem medycznym. Większość drobnoustrojów żyje w postaci biofilmów, jednak różnego rodzaju badania ich właściwości prowadzone są na formach planktonicznych, co z dużym prawdopodobieństwem prowadzi do uzyskiwania niewiarygodnych wyników.

Biofilm bakteryjny ma szczególne znaczenie w przypadku zakażeń układu moczowego u chorych przewlekle cewnikowanych, w patogenezie tych zakażeń istotną rolę może odgrywać materiał, z którego wykonany jest cewnik, zatem poszerzenie wiedzy na temat właściwości poszczególnych biomateriałów może mieć bardzo istotne implikacje kliniczne. Odrębną kwestią jest zapobieganie tworzenia biofilmu w już wprowadzonych cewnikach, jak również jego usuwanie. Jak dotychczas nie wprowadzono skutecznych, udokumentowanych w badaniach klinicznych metod zapobiegania tworzenia biofilmu wewnątrz i na powierzchni cewników, więc jest to wciąż otwarty obszar badań.



Przedstawiona do recenzji rozprawa mgr Moniki Oleksy-Wawrzyniak obejmująca 218 stron składa się ze wstępu, na który składa się z pięciu podrozdziałów; celu pracy, rozdziału opisującego materiał i metody, w którym Autorka niezwykle szczegółowo charakteryzuje szczepy bakteryjne uwzględnione w badaniach, jak również zastosowane metody badawcze i analizy statystycznej danych. Kolejny rozdział stanowią obszernie przedstawione wyniki, z bogatą dokumentacją graficzną i fotograficzną. W następnej części pracy Autorka omawia uzyskane wyniki na tle obszernego piśmiennictwa i formułuje wnioski. Praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, spis piśmiennictwa obejmujący 122 pozycje oraz suplement z tabelami zawierającymi wyniki oceny lekowrażliwości badanych szczepów bakteryjnych. Wartość pracy podnoszą liczne, starannie wykonane wykresy i diagramy, jak również doskonałej jakości fotografie, w tym z mikroskopu elektronowego.

Autorka w sposób bardzo przemyślany zaplanowała część doświadczalną pracy. W badaniu wstępnym oceniła zdolność tworzenia biofilmu przez wszystkie badane szczepy wykorzystując metodę adhezji do polistyrenu z barwieniem wytworzonej biomasy fioletem krystalicznym. Następnie 134 szczepy oraz 6 szczepów referencyjnych zostało poddane badaniu metodą Richards'a, gdzie wykazano wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie. Te dwie metody posłużyły do wyboru szczepów do dalszych, szczegółowych badań. Wykorzystując metodę ilościową oceniono zdolność do tworzenia biofilmu na powierzchni cewnika z polichlorku winylu inkubowanego w pełnym medium hodowlanym. Najsilniejsze zdolności tworzenia biofilmu prezentowały szczepy *Escherichia coli*. W kolejnym etapie doświadczeń, wybrano reprezentatywne grupy szczepów do badania w warunkach przepływowych i stacjonarnych z wykorzystaniem pełnego medium hodowlanego oraz imitującego moczu fizjologiczny oraz moczu pacjentów z cukrzycą. W warunkach przepływowych najsilniejsze zdolności tworzenia biofilmu ponownie wykazano dla szczepów *E. coli*, w warunkach stacjonarnych wykazano, że obecność glukozy stymuluje metabolizm *E. coli* i *Enterococcus faecium* do szybszej proliferacji, prawdopodobnie poprzez zwiększenie metabolizmu. W warunkach przepływowych dodatek glukozy również stymulował tworzenie biofilmu.



Dla wybranych szczepów izolowano macierz zewnątrzkomórkową i porównano jej skład przy użyciu technik chromatograficznych z formami planktonicznymi. W przypadku bakterii żyjących w biofilmie wykazano zwiększony poziom rozgałęzionych aminokwasów, pentoz i heksoz. W badaniach uwzględniono również ocenę tworzonego biofilmu przy wykorzystaniu skaningowego mikroskopu elektronowego, wykazując zróżnicowanie międzygatunkowe w strukturze biofilmu tworzonego na cewniku.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono ocenę eradykacji biofilmu przy wykorzystaniu wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych, wykazując najwyższą skuteczność poliheksanidyny, co może mieć w przyszłości istotne znaczenie w profilaktyce zakażeń układu moczowego u chorych cewnikowanych, jednak wymaga dalszych, rzetelnych badań klinicznych..

W przeprowadzonych badaniach Autorka dowiodła, że badane pałeczki Gram-ujemne posiadały wyższe zdolności tworzenia biofilmu w porównaniu ze szczepami *Enterococcus faecium*, niezależnie od warunków hodowli i użytego podłoża, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa. Dodatkowo, wykazała, że dodatek glukozy do podłoża stymuluje metabolizm komórek, a tym samym umożliwia tworzenie silniejszych struktur biofilmu.

Wykorzystując układ przepływowy, imitujący warunki *in vivo* wykazano, że wprowadzona metoda badawcza daje bardziej wiarygodne wyniki oceny tworzenia biofilmu niż pozostałe testy laboratoryjne, które są powszechnie stosowane. Doktorantka badała również zdolność różnych środków przeciwdrobnoustrojowych i czynników fizycznych do usuwania biofilmu, wykazując, że środki przeciwdrobnoustrojowe mają wyższą aktywność w przypadku wykorzystania sztucznego moczu, co przemawia za modyfikacją dotychczas używanych metod laboratoryjnych oceny ich skuteczności. Doktorantka nie wykazała skutecznego działania pola elektromagnetycznego, natomiast mechaniczne przepłukiwanie światła cewnika usuwało biofilm.

Praca przygotowana jest bardzo starannie, jednak pomimo tego, Autorce nie udało się uniknąć pewnych błędów językowych i miejscami wkradły się potoczne sformułowania,

niezgodne ze współcześnie stosowanym słownictwem medycznym, które poniżej, z obowiązku recenzenta pozwalam sobie wymienić:

- s. 21 wkłucia naczyniowe – winno być – cewniki naczyniowe
- s. 22 szkła kontaktowe – soczewki kontaktowe
- s. 42 rurki wentylacyjne – terminem stosowanym są rurki intubacyjne/tracheotomijne
- s. 45 odbieralnika – pojemnika/worka zbiorczego
- s. 194 uroinfekcja – zakażenie układu moczowego
- s. 193 abstrakt - abstract

Ponadto, w wielu miejscach pracy pojawia się termin „kateter” i „katetyzacja”, które należałoby, moim zdaniem, zastąpić słowami cewnik i cewnikowanie.

Zdarzyły się też pojedyncze błędy merytoryczne: Na stronie 29 Autorka podaje, że „do dezynfekcji skóry dłoni [...] są zalecane środki na bazie poliheksanidyny i oktenidyny”, podczas gdy, w świetle obowiązujących rekomendacji Światowej Organizacji Zdrowia, higienę rąk należy prowadzić przede wszystkim przy użyciu alkoholowych preparatów do dezynfekcji. Pomimo, że w badaniach objęto przede wszystkim pałeczki Gram-ujemne, Autorka nie wspomina w pracy o zmianach w taksonomii tych drobnoustrojów wprowadzonych w 2016 r., czyli włączeniu ich do rzędu Enterobacterales podzielonego na kilka rodzin.

Reasumując, pomimo drobnych niedociągnięć, przedstawiona do recenzji praca ma bardzo wysoką wartość merytoryczną i poznawczą. Doskonale zaplanowane doświadczenia i wszechstronne ujęcie podjętego tematu dowodzi dojrzałości naukowej Autorki.

Biorąc pod uwagę całość przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej stwierdzam, iż spełnia ona warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

Wydział Farmaceutyczny  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Propedeutyki Medycyny i Profilaktyki Zakażeń

p.o. Kierownik

dr hab. Aleksander Deptuła, prof. UMK

ul. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz

e-mail: [a.deptula@cm.umk.pl](mailto:a.deptula@cm.umk.pl)

tel. +48 608208231,

(Dz. U. RP nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami, w tym z Ustawą z dnia 28 kwietnia 2017 r. – O zmianie ustawy o stopniach i tytułach naukowych oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. RP poz. 859 z 2017 r.), dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego o dopuszczenie mgr Moniki Oleksy-Wawrzyniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką wartość merytoryczną przedłożonej do recenzji rozprawy składam jednocześnie wniosek o jej wyróżnienie.

p.o. KIEROWNIKA  
Katedry Propedeutyki Medycyny  
i Profilaktyki Zakażeń  
*Aleksander Deptuła*  
dr hab. n. med. Aleksander Deptuła, prof. UMK